

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2000 (03.05.00)	
International application No. PCT/JP99/05420	Applicant's or agent's file reference D2-001PCT
International filing date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)	Priority date (day/month/year) 01 October 1998 (01.10.98)
Applicant KIGAWA, Koji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 March 2000 (17.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer.

Diana Nissen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38





(51) 国際特許分類7 C12N 1/68, 15/10, C07H 21/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/20558 (43) 国際公開日 2000年4月13日(13.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05420 (22) 国際出願日 1999年10月1日(01.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/280380 ✓ 1998年10月1日(01.10.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ダイキン工業株式会社 (DAIKIN INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒530-8323 大阪府大阪市北区中崎西二丁目4番12号 梅田センタービル Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 木河浩司(KIGAWA, Koji)(JP/JP) 楠見佳代(KUSUMI, Kayo)(JP/JP) 向井恵吏(MUKAI, Eli)(JP/JP) 小幡和哲(OBATA, Kazuaki)(JP/JP) 〒566-8585 大阪府摂津市西一津屋1番1号 ダイキン工業株式会社 淀川製作所内 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開; 補正書受領の際には再公開される。 A
(54)Title: METHOD FOR PREPARING HIGH PERFORMANCE RecA-LIKE RECOMBINASE/SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID PROBE COMPLEX AND UTILIZATION THEREOF (54)発明の名称 高性能なRecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体の調整方法及びその利用 (57) Abstract An RecA-like recombinase/single-stranded nucleic acid probe/double-stranded target nucleic acid complex can be very efficiently and specifically formed by a method comprising preparing an RecA-like recombinase/single-stranded nucleic acid probe complex in the presence of a hardly degradable nucleotide cofactor which has molecules in a number 1/4 times or more larger than the number of the molecules contained in the nucleotide residues constituting the single-stranded nucleic acid probe but 10 times or less larger than the number of the molecules of the RecA-like recombinase, and bringing the obtained complex with a specimen containing the double-stranded target nucleic acid.		

分子数が、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、かつ、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、RecA様組換え酵素（リコンビナーゼ）/1本鎖核酸プローブ複合体を調製し、該複合体を2本鎖標的核酸を含む試料に接触させることによって、RecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ/2本鎖標的核酸複合体を極めて効率よく且つ特異的に形成させることができることを見いだした。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

高性能な RecA 様組換え酵素 / 1 本鎖核酸プローブ複合体
の調製方法及びその利用技術分野

本発明は、RecA 様組換え酵素（リコンビナーゼ） / 1 本鎖核酸プローブ複合体（single-stranded nucleoprotein filament）の調製方法、及び該方法により調製された RecA 様組換え酵素 / 1 本鎖核酸プローブ複合体の利用に関する。

従来の技術

in vitro で相同組換え反応（homologous pairing）及び／又は DNA 鎖交換反応（strand exchange）を触媒する種々の組換え酵素タンパク質（recombinase）が、多くの原核生物や真核生物から単離精製されている。これらの組換え酵素の中で現在までに最もよく研究されているのは、大腸菌由来の組換え酵素である RecA タンパク質である（柴田武彦、細胞工学、9、No.4、281-292、1990）。RecA タンパク質は、in vitro において相同な 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA 間の相同組換えを行い、相同的に対合した 3 重鎖 DNA 構造やその他の 3 本鎖の接合 DNA 分子（joint DNA molecule）を作ることが知られている（B.Rigas ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83、9591-9595、1986。P.Hsieh ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89、6492-6496、1992。L.J.Ferrin ら、Science、254、1494-1497、1991等）。また互いに相補的な 2 種類の 1 本鎖 DNA

（complementary single-stranded DNA）と、それらと相同な部位を有する 2 本鎖 DNA との間でダブル D ループと呼ばれる 4 本鎖 DNA 構造を作ること知られている（E.P.Sena、Nature Genetics、3、365-372、1993。V.K.Jayasena ら、J.Mol.Biol.、230、1015、1993）。さらに、RecA タンパク質は、DN

A-DNA間の対合反応のみならず、相同なRNAとの間でDNA-RNA間の対合反応を行い得ること (D.Kirkpatrick ら、Nucleic Acids Res., 20、4339-4346 及び 4347-4353、1992) や、相同なRNA/DNAハイブリッドとの間での対合反応を行い得ることも知られている (H.Kotani ら、Mol.Gen.Genet., 250、626-634、1996)。このような RecA タンパク質の特性を利用して、溶液中に微量に存在する (モル比で50～数百分子に1分子の割合) 特定の2本鎖標的DNAを単離する方法 (S.M.Honigberg ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83、9586-9590、1986。B.Rigas ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83、9591-9595、1986。M.Teintze ら、Biochem.Biophys.Res.Comm., 211、804-811、1995。米国特許4,888,274) や、固定した細胞中の2本鎖標的核酸を検出するインサイチュハイブリダイゼーション法が開発されている (W093/05177)。

しかしながら、試料中に極微量しか存在しない (例えばモル比で1,000分子に1分子以下の割合) ような2本鎖標的核酸分子を RecA タンパク質に代表される組換え酵素を利用してターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び/又は単離するためには、その目的に適したより高性能な RecA 様組換え酵素 (リコンビナーゼ) / 1本鎖核酸プローブ (2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む) 複合体 (single-stranded nucleoprotein filament) の調製法を開発し、反応効率、収率や特異性をさらに向上させる必要がある。

発明の開示

本発明は、試料中の2本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示す RecA 様組換え酵素 / 1本鎖核酸プローブ (2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む) 複合体の調製方法、並びに該方法により調製された RecA 様組換え酵素 / 1本鎖核酸プローブ複合体の2本鎖標的核酸配列の

ターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離への利用を提供することを課題とする。

相補的な配列を有する 2 本鎖標的核酸と効果的に且つ特異的に安定な複合体を形成し得る安定な RecA / 1 本鎖核酸プローブ複合体 (single-stranded nucleoprotein filament) を、ATP γ S 及び低濃度の Mg²⁺ の存在下、SSB (single-strand binding protein) 非存在下で、1 本鎖 DNA に RecA タンパク質を反応させて調製する方法が、すでに Radding らによって開発されている (米国特許 4,888,274)。彼らは、0.5–2mM の濃度の ATP γ S 存在下で行うのが好ましく、最低 0.5mM 以上必要であると述べている (同特許の 7 ページ及び請求項 8)。

しかし、本来 RecA タンパク質 1 分子に対して ATP 等のヌクレオチドコファクター 1 分子が結合すると考えられている。ATP をコファクターとして用いる場合は、RecA タンパク質自身が保有する ATPase 活性によって ADP に分解され、RecA タンパク質 / ADP 複合体は 1 本鎖 DNA から解離してしまうので、安定な RecA / 1 本鎖核酸プローブ複合体を形成させるためには大過剰の ATP もしくは ATP 再生系 (ホスホクレアチン + クレアチンキナーゼ等) を共存させる必要があるが、ATP γ S 等の ATPase によって分解されにくいコファクターを用いる場合は、ADP に分解されて RecA タンパク質 / ADP 複合体となって 1 本鎖核酸から解離することもなく、RecA タンパク質に対するアフィニティーも非常に強いので、大過剰に加える必要はないと本発明者らは考えた。また、本発明者らはこのような観点から、ATP γ S 等の該難分解性ヌクレオチドコファクターについては、反応液中での絶対的な濃度ではなく、反応中に存在する 1 本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数や、RecA タンパク質の分子数に対して何分子程度の該難分解性ヌクレオチドコファクターが存在するのが最適かを論じるべきであると考えた。

Radding らの米国特許 4,888,274 号明細書には、「相補的な配列を有する 2

本鎖標的DNAと効果的に且つ特異的に安定な複合体を形成し得る安定な RecA/1本鎖DNAプローブ複合体の形成は、0.5-2mMの Mg^{2+} 、0.5-2mMの ATP γ S、0.1-50 μ M(この場合のモル数はDNAを構成するヌクレオチド残基のモル数であり、1M=350g/lである。)の1本鎖DNA、及び1本鎖DNAの1/4量以上、好ましくは1/3量(約0.033-16.7 μ M)の RecA タンパク質存在下で行うのが好ましい」と記載されている(同特許の7~8ページ)。この場合のATP γ Sの分子数は、1本鎖DNAを構成しているヌクレオチド残基の分子数の10倍から2万倍、また RecA タンパク質の分子数の約30倍から60,000倍に相当する。また、「該 RecA/1本鎖DNAプローブ複合体をもちいて塩基配列特異的なプローブ/RecA/2本鎖標的DNA複合体を効率よく形成させるためには、試料中の全DNA(プローブ+2本鎖DNA)量に依存して RecA 量を最適化する必要がある。」とも記載されており(同特許の9~10ページ)、1.6mMのATP γ S、8fmol(100 μ l中。この量はヌクレオチド残基のモル数では約0.46 μ Mになる。同特許の10ページの43~49行)の1本鎖プローブ、0.32nMの2本鎖DNA存在下で、RecA 量を0.08~5.12 μ Mに変化させた実験により、その場合の最適 RecA 量が0.32 μ Mであり、0.16 μ Mより下や0.64 μ Mより上の RecA 濃度では該プローブ/RecA/2本鎖標的DNA複合体の形成が低下したと述べている。従って、この場合のATP γ Sの分子数は、1本鎖プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の約3,500倍、また RecA タンパク質の分子数の2,500~10,000倍に相当する。

上記のように通常は大過剰のATP γ S等の難分解性ヌクレオチドコファクター(最低でも、1本鎖プローブに含まれるヌクレオチド残基の分子数の10倍、また RecA タンパク質の分子数の30倍のATP γ S)が使用されている。本発明者らは、ATP γ S等の RecA 様組換え酵素自身が保有するATPase等のヌクレオシドトリホスファターゼ活性によって分解されにくい難分解性ヌクレオチドコファクターを使用する場合は、従来法のように大過剰に加える必要

はなく、ATP γ S等の難分解性ヌクレオチドコファクターが大過剰存在するとむしろRecAタンパク質／1本鎖核酸プローブ／2本鎖標的核酸複合体形成の反応効率、収率や特異性に悪影響を及ぼすのではないかと考え、反応中に存在する、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数やRecAタンパク質の分子数の何倍程度の該難分解性ヌクレオチドコファクターが存在するのが最適かを詳細に検討した結果、該難分解性ヌクレオチドコファクターの分子数が、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下、好ましくは5倍以下、より好ましくは3倍以下である条件下で、RecA様組換え酵素(リコンビナーゼ)／1本鎖核酸プローブ(2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む)複合体(single-stranded nucleoprotein filament)を調製し、該複合体を2本鎖標的核酸を含む試料に接触させることによって、RecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ／2本鎖標的核酸複合体を極めて効率よく且つ特異的に形成させることができることを見いだした。

さらに、本発明者らは、調製したRecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を用いて2本鎖標的核酸に対し相同組換え反応を行う際に、1価のカチオンを共存させることにより、該反応の精度(fidelity)や特異性のみならず、反応効率や収量を著しく向上させることができることを見いだし、これにより本発明を完成するに至った。

本発明は、試料中の2本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示すRecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ(2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む)複合体の調製方法、並びに該方法により調製されたRecA様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体の2本鎖標的核酸配列のターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び／又は単離への利用に関し、より詳しくは、

- (1) 分子数が1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子

数の1/4以上で、かつ、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させることを特徴とする、RecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を調製する方法、

(2) 難分解性ヌクレオチドコファクターが $ATP\gamma S$ 、 $ADP \cdot AlF_4^-$ (ATP 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は ADP 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $dADP \cdot AlF_4^-$ ($dATP$ 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は $dADP$ 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $ADP \cdot BeF_3^-$ (ATP 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は ADP 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、又は $dADP \cdot BeF_3^-$ ($dATP$ 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は $dADP$ 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)である(1)に記載の方法、

(3) ホモプローブが、互いに十分に相補的な少なくとも2種類のホモプローブである、(1)に記載の方法、

(4) 1本鎖核酸プローブ試料が、ホモプローブと、少なくとも1種類のヘテロプローブとの混合物である、(1)～(3)のいずれかに記載の方法、

(5) 0.5～2.0mMの Mg^{2+} 存在下で1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させる、(1)に記載の方法、

(6) RecA様組換え酵素が原核生物由来である、(1)に記載の方法、

(7) RecA様組換え酵素が大腸菌由来である、(1)に記載の方法、

(8) RecA様組換え酵素が標識又はリガンドを有する、(1)、(6)、(7)のいずれかに記載の方法、

(9) ホモプローブが標識又はリガンドを有する、(1)～(7)のいずれかに記載の方法、

(10) (1)～(9)のいずれかに記載のRecA様組換え酵素/1本鎖核

酸プローブ複合体の調製に用いるための、RecA 様組換え酵素及び難分解性ヌクレオチドコファクターを含むキット、

(11) 試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) (9) に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された 2 本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、及び

(c) 固相に捕捉されなかった 2 本鎖核酸及びプローブを除去する工程、を含む方法、

(12) 試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) (9) に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を形質転換可能なベクターに挿入された 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された 2 本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、

(c) 固相に捕捉されなかった 2 本鎖核酸及びプローブを除去する工程、

(d) 固相に捕捉された 2 本鎖標的核酸を含む画分を固相から遊離し、該 2 本鎖標的核酸を含む画分を適当な宿主細胞に形質転換する工程、及び

(e) 該 2 本鎖標的核酸を有する形質転換細胞を選択する工程、を含む方法、

(13) 標識又はリガンドが、ビオチン又はジゴキシゲニンである、(8)、

(9)、(11)、(12) のいずれかに記載の方法、

(14) 固相が、アビジン (ストレプトアビジン) 又は抗ジゴキシゲニン抗体を結合させた磁性ビーズ (マグネットビーズ) である、(13) に記載の方法、

(15) (8) 又は (9) に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を用いる、固定細胞試料中に存在する 2 本鎖標的核酸をインサイチュハイブリダイゼーション法によって検出する方法、

(16) (1) ～ (9) のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を用いる、生細胞試料中に存在する 2 本鎖標的核酸をインビボ遺伝子ターゲティング法によってターゲティングする方法、

(17) 2 本鎖標的核酸が 2 本鎖標的 DNA である、(1)、(11)、(12)、(15)、(16) のいずれかに記載の方法、

(18) 1 価のカチオン共存下で RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体と 2 本鎖標的核酸を含む試料とを反応させることを特徴とする、(11) ～ (16) のいずれかに記載の方法、

(19) 1 価のカチオンがナトリウムイオン又はカリウムイオンである、(18) に記載の方法、

(20) ナトリウムイオンが 150mM 以下の塩化ナトリウム又は 250mM 以下の酢酸ナトリウムに由来し、カリウムイオンが 150mM 以下の塩化カリウム又は 250mM 以下の酢酸カリウムに由来する、(19) に記載の方法、

(21) (1) ～ (9) のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を含む、試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離するためのキット、を提供するものである。

なお、本発明において「ホモプローブ (homologous probe)」とは、2 本鎖標的核酸配列と十分な相補性を有する 1 本鎖核酸プローブを指し、「ヘテロプローブ (heterologous probe)」とは、2 本鎖標的核酸配列と十分な相補性を有しない 1 本鎖核酸プローブを指す。また、本発明において、単に「プローブ」といった場合には、ホモプローブ単独、またはホモプローブとヘテロプローブの混合物を指す。

また、本発明において「難分解性ヌクレオチドコファクター」とは、RecA 様組換え酵素自身が保有する ATPase 等のヌクレオシドトリホスファターゼ活性によって分解されにくいヌクレオチドコファクターを指す。

また、本発明において「2本鎖標的核酸」とは、ホモプローブが標的とする2本鎖核酸を指す。本発明において、単に「2本鎖核酸」といった場合には、2本鎖標的核酸及びホモプローブが標的としない2本鎖核酸の双方を含む。

本発明に使用し得る組換え酵素 (recombinase) とは、in vitro で相対的対合反応 (homologous pairing) 及び／又は DNA 鎖交換反応 (strand exchange) を触媒し得る、大腸菌 RecA タンパク質と実質的に同等な RecA 様組換え酵素タンパク質の一群のことであり、多くの原核生物や真核生物から単離精製されている。例えば、大腸菌 RecA タンパク質の野生型 (T. Shibata ら、Methods in Enzymology、100、197、1983) 及びその変異型 (例えば RecA 803: M. Madiraju ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85、6592、1988。RecA 441: H. Kawashima ら、Mol. Gen. Genet.、193、288、1984他)、その類似タンパク質である T4 ファージ由来の uvsX タンパク質 (T. Yonesaki ら、Eur. J. Biochem.、148、127、1985)、枯草菌 (Bacillus subtilis) 由来の RecA タンパク質 (C. M. Lovett ら、J. Biol. Chem.、260、3305、1985)、黒穂菌 (Ustilago) 由来の Rec1 タンパク質 (E. B. Kmieć ら、Cell、29、367、1982)、Thermus aquaticus や Thermus thermophilus のような耐熱性菌由来の RecA 様タンパク質 (E. Angov ら、J. Bacteriol.、176、1405、1994。R. Kato ら、J. Biochem.、114、926、1993)、酵母、マウス、ヒト由来の RecA 様タンパク質 (A. Shinohara ら、Nature Genetics、4、239、1993) を包含する。

大腸菌の RecA タンパク質は、常法 (例えば、S. Kuramitsu ら、J. Biochem.、90、1033、1981。T. Shibata ら、Methods in Enzymology、100、197、1983。) により大腸菌から精製して使用し得る。又は、市販の RecA タンパク質 (ベーリンガーマンハイム社製、プロメガ社製等) を使用し得る。また、大腸菌の RecA

タンパク質の定量は、「extinction coefficient $\epsilon_{280}^{1\%} = 5.9$ 」(N.L.Craig ら、J.Biol.Chem., 256, 8309-8044, 1981)に基づいて行った。

本発明に用いられる 2 本鎖標的核酸は、DNA、cDNA や RNA (DNA/RNA ハイブリッド、2 本鎖構造を有する RNA 領域等) を包含し、その長さ、種類、形状等について特に制限はなく、環状 (閉環状・開環状)、直鎖状 いずれでも差し支えない。好ましくは、2 本鎖標的核酸は 2 本鎖標的 DNA である。原核生物や真核生物由来のジェノミック DNA や cDNA、ウイルスやファージ由来の DNA、及びそれらのジェノミック DNA や cDNA の断片、またそれらの各種 DNA を含む各種の DNA ライブラリー等のあらゆる種類の 2 本鎖 DNA が使用され得る。また溶液中に存在する場合のみならず、常法により有機溶媒 (メタノール、エタノール等)、酸 (酢酸等)、や架橋剤 (ホルマリン、バラホルムアルデヒド等) 等で固定された細胞もしくは細胞構造体 (細胞内に存在する、細菌、ウイルス、又は核やミトコンドリアなどの器官、染色体、あるいは、ウイルス、細菌などの血液サンプルなどの生体由来の試料に存在する寄生体を包含) や、固定されていない生細胞もしくは細胞構造体に含まれていてもよい。

また、2 本鎖標的核酸は必要に応じて、常法により RI (^{32}P 、 ^{35}S 等)、蛍光色素 (FITC、ローダミン等)、酵素標識 (パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、化学発光剤 (アクリジニウムエステル等)、ビオチンやジゴキシゲニン等の種々の標識又はリガンドによって、検出及び/又は単離のために標識され得る。

本発明に用いられる 1 本鎖核酸プローブは、1 本鎖の核酸であり、通常は 1 本鎖の DNA が用いられる。形状については特に制限はなく、環状であっても直鎖状であっても差し支えない。1 本鎖核酸プローブ試料は、標的配列と十分な相補性を有する 1 本鎖核酸プローブ (ホモプローブ) のみでもよいし、標的配列と十分な相補性を有しない 1 本鎖核酸プローブ (ヘテロプローブ) との混

合物でもよい。ヘテロプローブを混合させることにより、特異性が向上することが知られている (PCT/JP97/03019)。使用する 1 本鎖核酸プローブの量は、該試料核酸の総量及びその中に含まれる該 2 本鎖標的核酸の量等に合わせて最適化する必要がある。

本発明に用いられる前記「標的配列と十分な相補性を有する 1 本鎖核酸プローブ (ホモプローブ)」は、該標的配列の一部又は全体の塩基配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有する配列をその中に含んでいる 1 本鎖核酸であり、通常は該配列を含む 1 本鎖 DNA である。通常ホモプローブは、2 本鎖標的 DNA とホモプローブとの間の塩基配列特異的な相同組換え反応 (homologous pairing によるハイブリダイゼーション反応) を確実に実施するために、該 2 本鎖標的 DNA 配列の一部又は全体の塩基配列と少なくとも 90% 以上の相同性を有する配列をその中に含んでいることが好ましく、95% 以上の相同性を有する配列をその中に含んでいることがさらに好ましい。

該標的配列の一方又は両方の鎖に相補的な 2 本鎖核酸プローブを変性することによっても調製し得る。上記ホモプローブ鎖は、また、試料中のいずれの DNA 鎖にも相補的でない末端伸張配列部分を含有し得る。2 本鎖プローブの両方の鎖がこのような末端伸張配列部分を含有する場合は、これらの伸張部分は互いに相補的で有り得る。

市販の多くの 1 本鎖又は 2 本鎖核酸プローブを使用し得る。あるいは、当該技術分野で公知のプローブ調製法により、例えば、該配列を有するプラスミドやコスミド又はその他のベクターから直接調製され得る。必要に応じて、ベクターからプローブ部分を制限酵素で切り出し、電気泳動によって特異的な制限酵素断片を単離したり、PCR 法によってプローブ部分のみを増幅することにより調製され得る。このようにして得られたプローブは通常 2 本鎖であるが、必要に応じてこれらを 1 本鎖に変性したり、M13 ファージベクターのような 1 本鎖ベクターにサブクローニングして使用し得る。あるいはオリゴヌクレオチ

ド合成法によって1本鎖プローブを調製し得る。長いプローブを調製する場合は、プローブのサブフラグメントを合成した後、それらのサブフラグメントをつなぎ合わせて調製され得る。

前記ホモプローブが有すべき標的配列と相同な配列の長さは少なくとも15塩基以上であり、好ましくは25～2,000塩基であり、より長い(2,000塩基以上)ポリヌクレオチドプローブも使用され得る。

また、ホモプローブは必要に応じて、常法によりRI (^{32}P 、 ^{35}S 等)、蛍光色素(FITC、ローダミン等)、酵素標識(パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、化学発光剤(アクリジニウムエステル等)、ビオチンやジゴキシゲニン等の種々の標識又はリガンドによって、検出及び/又は単離のために標識され得る。

本発明に用いられる前記「ヘテロプローブ」とは、標的配列と十分な相補性を有しない核酸プローブを指し、通常は1本鎖DNAである。標的配列以外の配列、例えば、標的配列が挿入されているベクター部分の配列等とは、相補性が低いことが好ましい。

形状については特に制限はなく、環状であっても直鎖状であっても差し支えない。2本鎖核酸ヘテロプローブを変性することによっても調製し得る。

例えば、該試料DNAがヒト由来DNAであるような場合は、ウイルスやバクテリオファージを含む種々の微生物由来の1本鎖核酸プローブ(好ましくはM13やφX174等の1本鎖ファージDNAやラムダファージ由来のDNA断片を1本鎖化したもの)、ヒト以外の真核生物由来の1本鎖核酸プローブ(好ましくはサケ精子やニシン精子由来のDNA断片を1本鎖化したもの)等をヘテロプローブとして使用し得る。また、ランダムな配列を有する適度な長さの合成DNA混合物もヘテロプローブとして使用し得る。

ヘテロプローブは通常いかなる標識又はリガンドも有していない。前記ヘテロプローブの長さは少なくとも15塩基以上であり、好ましくは30～10,000塩基

であり、より好ましくは60～7,000塩基であり、より長い(10,000塩基以上)ポリヌクレオチドプローブも使用され得る。

尚、ホモプローブとヘテロプローブとを混合して使用する場合の両者の好ましい重量比は、約1:1から約1:500程度である。使用するホモプローブ及びヘテロプローブの総量や両者の重量比については、該試料核酸の総量及びその中に含まれる該2本鎖標的核酸の量等に合わせて最適化する必要がある。

本発明に使用され得る難分解性ヌクレオチドコファクターとしては、ATP γ S、ADP \cdot AlF $_4^-$ (ATP \cdot 硝酸アルミニウム \cdot フッ化ナトリウム混合物又はADP \cdot 硝酸アルミニウム \cdot フッ化ナトリウム混合物)、dADP \cdot AlF $_4^-$ (dATP \cdot 硝酸アルミニウム \cdot フッ化ナトリウム混合物又はdADP \cdot 硝酸アルミニウム \cdot フッ化ナトリウム混合物)、ADP \cdot BeF $_3^-$ (ATP \cdot 硫酸ベリリウム \cdot フッ化ナトリウム混合物又はADP \cdot 硫酸ベリリウム \cdot フッ化ナトリウム混合物)やdADP \cdot BeF $_3^-$ (dATP \cdot 硫酸ベリリウム \cdot フッ化ナトリウム混合物又はdADP \cdot 硫酸ベリリウム \cdot フッ化ナトリウム混合物)が挙げられる(L.P.Moreauら、J.Biol.Chem.、264、2302-2306、1989。A.J.Langeら、J.Biol.Chem.、261、101-107、1986。S.C.Kowalczykowskiら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、92、3478-3482、1995)。

上記難分解性ヌクレオチドコファクターの分子数が、1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下、好ましくは5倍以下、より好ましくは3倍以下である条件下で、ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させることによって、試料中の2本鎖標的核酸のターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び/又は単離に適したRecA様組換え酵素(リコンビナーゼ)/1本鎖核酸プローブ複合体(single-stranded nucleoprotein filament)を調製する。尚、ATP γ Sを使用する場合は、ATP γ Sの3～4倍量のADPを共存させてもよい。

すなわち、前記ホモプローブ単独又はホモプローブとヘテロプローブの混合物を、通常予め約95～100℃で約5分間程度熱変性して1本鎖核酸プローブ試料を調製し、約20秒から1分間氷冷した後、前記 RecA タンパク質との結合反応に使用する。必要に応じて RecA タンパク質との結合反応前に約5～20秒間程度0～4℃で遠心する。変性によって1本鎖化されたプローブは-20℃のフリーザーで保存し得るが、好ましくは、氷水中で直ちに該1本鎖化プローブに上記の量比の該難分解性ヌクレオチドコファクターと RecA タンパク質とを標準的な RecA コーティング反応溶液〔反応液中の各成分の最終濃度が以下の範囲になるように調製し得る；1～100mM（好ましくは10～35mM）トリス塩酸又は酢酸緩衝液（pH約7.5）、0.5～12.5mM（好ましくは0.5～2mM）塩化マグネシウム又は酢酸マグネシウム、0～50mM 塩化ナトリウム又は塩化カリウム、もしくは0～100mM 酢酸ナトリウム又は酢酸カリウム、0～1mM ジチオスレイトール、0～100mM E G T A、0～50mM スベルミジン、0～10%グリセロール〕中で混合する。混合液の総量としては、100 μ l 以下が好ましく、5～40 μ l 程度がより好ましい。この混合液を37℃で5～20分間保温することによって、1本鎖核酸プローブ試料に RecA タンパク質を結合させて RecA タンパク質／1本鎖核酸プローブ複合体（single-stranded nucleoprotein filament）を形成させる。

上記のコーティング反応溶液には、少なくとも1本鎖核酸プローブを構成している4ヌクレオチド残基に対して1分子以上、好ましくは3ヌクレオチド残基に対して1分子以上の割合で RecA タンパク質を添加する必要がある、RecA タンパク質の総量については、使用する1本鎖核酸プローブ量のみならず、2本鎖標的核酸を含む該核酸試料の総量等に合わせて最適化する必要がある。

必要に応じて、SSB（single-strand binding protein）、トポイソメラーゼ I やトポイソメラーゼ II などの共存下で実施し得る。

また、場合によっては、1本鎖化された核酸プローブ、該難分解性ヌクレオ

チドコファクターと RecA タンパク質とを標準的な RecA コーティング反応溶液と混合する際に、同時に 2 本鎖標的核酸を含む試料核酸も加えて、RecA タンパク質／1 本鎖核酸プローブ複合体の形成と、該複合体と 2 本鎖標的核酸との相同組換え反応 (homologous pairing) とを同時に行うことも可能である。ただし、その場合には Mg^{2+} の濃度を 4 mM 以上にしておくか、スベルミジンを共存させるのが好ましい。

また前記ホモプローブについては、W095/18236 に記載されているような種々の標識又はリガンドを有する RecA タンパク質と結合させて標識又はリガンド付 RecA タンパク質／ホモプローブ複合体を調製して使用することもできる。ヘテロプローブについてはそのような種々の標識又はリガンドを有する RecA タンパク質との複合体を調製して使用することは好ましくない。

上記のように本発明に従って調製された RecA タンパク質／1 本鎖核酸プローブ複合体を、該 2 本鎖標的核酸が変性されない条件、例えば 2 本鎖核酸の変性がおこる温度以下で、該試料核酸に添加し、相同組換え反応 (homologous pairing) に適した条件下で、5 分～24 時間、好ましくは 10 分～2 時間、37°C で反応させることによって、該 2 本鎖標的核酸と RecA タンパク質／1 本鎖核酸プローブ複合体との複合体 (RecA タンパク質／1 本鎖核酸プローブ／2 本鎖標的核酸複合体) を形成させ得る。

この相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) に適した反応条件とは、上記 RecA コーティング反応の条件とほぼ同じで、下記の反応溶液中で実施し得る。即ち、反応液中の各成分の最終濃度が以下の範囲になるように調製する。

1～100mM (好ましくは 10～35mM) トリス塩酸又は酢酸緩衝液 (pH 約 7.5)、4～25mM (好ましくは 4～12.5mM) 塩化マグネシウム又は酢酸マグネシウム、0～150mM 塩化ナトリウム又は 0～250mM 酢酸ナトリウム又は 0～150mM 塩化カリウム又は 0～250mM 酢酸カリウム、0～1 mM ジチオスレイトール、0～100mM EGTA、0～50mM スベルミジン、0～10% グリセロール。

相同組換え反応時に反応系に新たにヌクレオチドコファクターを添加する必要はない。相同組換え反応に使用する該 RecA タンパク質／1 本鎖核酸プローブ複合体の量については、2 本鎖標的核酸を含む該核酸試料の総量等に合わせて最適化する必要がある（米国特許第4,888,274号。PCT/JP97/03019）。

本発明に従って調製したRecA様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を用いて2 本鎖標的核酸に対し相同組換え反応を行う際に、1 価のカチオン、例えば、150mM以下の塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は250mM以下の酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムを共存させることにより、該反応の精度（fidelity）や特異性のみならず、反応効率や収量を向上させることができる。添加する塩の種類や濃度は、2 本鎖標的核酸の種類、形状（閉環状、開環状、直鎖状）やホモプローブが有する標的配列と相同な配列の長さ等に合わせて最適化する必要がある。例えば、2 本鎖標的核酸が閉環状の2 本鎖DNAである場合には、25～150mMの塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は50～250mMの酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムを共存させることにより、該反応の精度（fidelity）や特異性のみならず、反応効率や収量を著しく向上させることができる。

このことは、大過剰のATP γ SやATPの存在下で、RecAタンパク質／1 本鎖DNAプローブ複合体の調製と2 本鎖標的DNAとの相同組換え反応とを同時に行った場合に見られた「100mM の塩化カリウム存在下で相同組換え反応を行うと、プローブ／2 本鎖標的DNA複合体の収量は変化せずに、精度（fidelity）や特異性だけが向上する（V.A.Malkov ら、J.Mol.Biol., 271、168-177、1997）」とか、「DNA鎖交換反応（strand exchange）は、50mM のナトリウム塩によって部分的に阻害され、100mM の塩化ナトリウムもしくは200mM の酢酸ナトリウム存在下ではほぼ完全に阻害される（L.J.Roman ら、Biochemistry, 25、7375-7385、1986）」とか、「Dループ形成反応（D-loop formation）は、20mMの塩化ナトリウムによって20%阻害され、50mMの塩化ナト

リウムによって完全に阻害される (T. Shibata ら、J. Biol. Chem., 256、7565-7572、1981)」とかといった従来の知見とは、全く異なる新しい知見である。

本発明に従って調製された RecA タンパク質／種々の標識もしくはリガンドを有するホモプローブ複合体、又は種々の標識もしくはリガンドを有する RecA タンパク質／ホモプローブ複合体と、それらを用いた相同組換え反応によって、2本鎖標的核酸との間で形成された複合体 (RecA タンパク質／種々の標識もしくはリガンドを有するホモプローブ／2本鎖標的核酸複合体、又は種々の標識もしくはリガンドを有する RecA タンパク質／ホモプローブ／2本鎖標的核酸複合体) や、RecA タンパク質／ホモプローブ複合体と、種々の標識又はリガンドを有する 2本鎖標的核酸との間で形成された複合体 (RecA タンパク質／ホモプローブ／種々の標識又はリガンドを有する 2本鎖標的核酸複合体) の検出又は単離は、公知の方法によって行い得る (米国特許第4,888,274号。W093/05177。W093/05178。W095/18236。M. Teintze ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 211、804-811、1995。PCT/JP97/03019等)。

2本鎖標的DNAの好ましい濃縮、検出及び／又は単離方法としては、例えばビオチンで標識したホモプローブ (ビオチン標識ホモプローブ) と非標識ヘテロプローブとを適当な比率で混合して調製した1本鎖DNAプローブ試料、少なくとも1本鎖DNAプローブの4ヌクレオチド残基に対して1分子以上の RecA タンパク質、及び少なくとも1本鎖DNAプローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で RecA タンパク質の分子数の10倍以下 (好ましくは5倍以下、より好ましくは3倍以下) の分子数の、ATP γ S等の難分解性ヌクレオチドコファクターを、pH7.5で、0.5~2mMのMg²⁺が存在する条件下で37°Cで反応させて RecA タンパク質／1本鎖核酸プローブ複合体を調製し、該複合体を2本鎖標的DNAを含む試料核酸に加えて、4~12.5mMのMg²⁺、150mM以下の塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は250mM以下

の酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウム存在下で、37°Cで相同組換え反応をさせた後、形成されたビオチン標識ホモプローブ／2本鎖標的DNA複合体をストレプトアビジン結合マグネットビーズ（ダイナル社製等）で捕捉し、捕捉されなかった2本鎖核酸やプローブを洗浄した後、ビーズに結合したビオチン標識ホモプローブ／2本鎖標的DNA複合体を、塩化ナトリウムを含有する溶液中で室温～85°Cで約5～15分程度処理することによって該2本鎖標的DNAを含む画分を遊離（溶出）させる方法が挙げられる。また、このようにして回収された該2本鎖標的DNAを含む画分を、適当なベクターに挿入した後、適当な宿主細胞に形質転換し、該2本鎖標的DNAを有する形質転換細胞を選択し、該形質転換細胞から該標的DNAを回収することも可能である。尚、該2本鎖標的DNAが元々形質転換可能なベクターに挿入されている場合は、新たにベクターに挿入し直す必要はなく、そのまま形質転換に使用し得る。

本発明に従って調製された RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体の利用法としては、まず、cDNAやジェノミックDNAの混合物から標的遺伝子を濃縮及び／又は単離し、そのクローニングを行うことや、種々の遺伝子ライブラリー（cDNAライブラリー、又は、コスミド、P1、BACやYAC等のジェノミックDNAライブラリー）から標的遺伝子をスクリーニングすることが挙げられる。

また、標的DNA配列の増幅（米国特許第5,223,414号、W091/17267）や、オリゴヌクレオチドプローブを利用するRARE（RecA-assisted restriction endonuclease cleavage）法（L.J.Ferrinら、Nature Genetics、6、379、1994）を含む種々の遺伝子マッピング（B.M.J.Revetら、J.Mol.Biol.、232、779、1993）、オリゴヌクレオチドを利用する標的DNAの塩基配列特異的な修飾（メチル化やアルキル化など）や切断（M.Koobら、Nucleic Acid Res.、20、5831、1992。E.I.Golubら、Nucleic Acid Res.、20、3121、1992。A.Mikhailら、Biochemistry、34、13098、1995）にも利用することが可能である。

また、cDNAやジェノミックDNA等の混合物を含む臨床検体から、特定の標的DNAを単離及び／又は検出することによる、各種遺伝子異常や変異の診断及び、種々の病原性微生物やウイルスによる感染症の診断にも利用可能である。

さらには、本発明に従って調製された RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体は、W093/05177 や W095/18236 に記載されている RecA タンパク質を利用するインサイチュハイブリダイゼーション法にも利用可能であり、また、生細胞中での遺伝子ターゲティング (in vivo gene targeting) により遺伝子の改変や転写阻害等を行うことによる遺伝子治療法やトランスジェニック法 (米国特許第5,468,629号、W093/22443、E.I.Golub ら、Nucleic Acid Res., 20, 3121、1992、E.I.Golub ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90, 7186、1993 等) にも利用可能である。

本発明はまた、本発明に従って RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を調製するためのキットを提供する。このキットには、適正な量の RecA 様組換え酵素及び難分解性ヌクレオチドコファクターが含まれる。また、例えば、ヘテロプローブを含んでもよい。

本発明はさらに、本発明に従って調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を含む、試料核酸中の2本鎖標的核酸のターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離するためのキットを提供する。このキットには RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体以外の他の要素として、例えば、反応停止液、未反応の2本鎖核酸や1本鎖核酸プローブを洗浄するための洗浄液、2本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を補足するための固相 (例えば、磁性ビーズなど)、及び／又は溶出液を含んでもよい。

発明を実施するための最良の形態

本発明を説明するために以下の実施例を示す。これらの実施例は、本発明の例示であり、本発明を限定するものではない。

〔実施例 1〕 標的 DNA、非標的 DNA、ホモプローブ及びヘテロプローブの調製

(1) 2本鎖標的及び非標的 DNA の調製

環状の 2 本鎖標的 DNA としてヒトガン抑制遺伝子である p53 の全 cDNA 配列を含む全長 6.6kb のプラスミド php53B (R. Zakut-Houri ら、EMBO J., 4, 1251, 1985)、環状の 2 本鎖非標的 DNA としてプラスミドベクターである pUC18 (2.7kb) を、それぞれ QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN GmbH 社製) を用いてこれらのプラスミドを含む大腸菌より精製した。

(2) ホモプローブの調製

p53 の cDNA の部分配列を有し、その 5' 末端がビオチン化されている 2 本鎖 275bp のフラグメントを、5' 末端がそれぞれビオチン化されているプライマー「5'-CCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'」(配列番号: 2 / 配列番号: 1 の塩基配列の 1~25 番目に対応する) 及び「5'-CGTGCAAGTCACAGACTTGGCTGTC-3'」(配列番号: 3 / 配列番号: 1 の塩基配列の 251~275 番目に対応する)、Taq ポリメラーゼを用いる標準的な DNA 増幅反応条件 (PCR 法) によって調製し、使用時に熱変性して 1 本鎖化したものをホモプローブとして用いた。p53 cDNA のこの領域の塩基配列を配列番号: 1 に示す。

(3) ヘテロプローブの調製

サケ精子由来の DNA (シグマ社製、Type III) を、常法 (T. Maniatis ら、Molecular Cloning) によりフラグメント化した後、熱変性して 1 本鎖化したものをヘテロプローブとして用いた。

〔実施例 2〕 ATP γ S 存在下での RecA タンパク質 / 1 本鎖 DNA プローブ複合体 (single-stranded nucleoprotein filament) の調製

実施例 1 (2) で調製した p53 の cDNA 配列の一部からなる 275bp の 5'

末端をビオチン化した2本鎖ホモプローブと、実施例1(3)で調製したヘテロプローブとを混合したものを、滅菌水又はTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH7.5)で希釈し、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに入れて沸騰水中で5分間加熱処理することにより2本鎖プローブを変性した。チューブを氷水中に移して急冷した後、1.0 μ lの10 \times コーティングバッファー[300mM Tris-HCl (pH7.5 at 37°C)、20mM MgCl₂、4mM DTT、30%グリセロール]、1.0 μ lのATP γ S(シグマ社製)溶液(種々の濃度に調製)、RecAタンパク質(ベーリンガーマンハイム社製)を加え、全量が10 μ lになるように滅菌水で希釈して37°Cで12分間反応させることにより、種々の条件下でRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体(single-stranded nucleoprotein filament)の調製を行った。1本鎖プローブ(ホモプローブ+ヘテロプローブ)濃度(プローブを構成するヌクレオチド残基のモル濃度。1M=350g/l)、ATP γ S濃度、RecAタンパク質濃度、ATP γ S/ヌクレオチド残基(モル比)、ATP γ S/RecAタンパク質(モル比)に関する詳しい条件は表1に示す通りである。

[実施例3] RecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体を利用する2本鎖標的DNAの単離(標的DNA:非標的DNA=1:50,000)

A. 相同組換え(homologous pairing)反応によるハイブリダイゼーション

1.0 μ lの10 \times 反応バッファー[300mM Tris-HCl (pH7.5 at 37°C)、20mM MgCl₂、4mM DTT、30%グリセロール]、1.0 μ lの80mM MgCl₂溶液、実施例1(1)で調製した2本鎖環状標的DNAであるphp53Bを49pg、2本鎖環状非標的DNAであるpUC18を1 μ g(標的DNAと非標的DNAのモル比は1:50,000)、及び表2に示した濃度になるように必要に応じてNaCl、CH₃COONa、KClやCH₃COOK溶液を混合し、全量が10 μ lになるように滅菌水で希釈したものと、実施例2で調製したRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ(ホモプローブ+ヘテロプローブ)複合体10 μ lとを混合し(最終的な反応液量はいずれの場合も

20 μ l)、該複合体存在下で37°Cで45分間反応させた後、EDTA (final 10mM 程度) を含む反応停止液を添加して反応を停止させた。各反応に使用した RecA タンパク質／1本鎖DNAプローブ複体の調製条件や、各反応に含まれる塩の種類 (NaCl、CH₃COONa、KCl、CH₃COOK) や濃度については表2に示す通りである。

B. 磁性ビーズによる捕捉／単離

ストレプトアビジンでコートされた磁性ビーズ (DYNAL社製) 20 μ l を0.6ml 容量のマイクロ遠心チューブに取り、磁性ビーズ分離ラック (MAGNA-SEP) を用いて100 μ l の30mM Tris-HCl、50mM NaCl (pH7.5) で2回洗浄した。洗浄液を除去後、これらの洗浄した磁性ビーズを含むマイクロ遠心チューブに、上記の反応液 (反応停止液を含む) を全量加えてよく混合し、室温で15分間放置して捕捉した。この間、2～3分間毎に攪拌した。磁性ビーズ分離ラックを利用してビーズを分離し、上清を除去した後、ホモプローブ／2本鎖標的DNA複合体が壊れない条件 (B. Rigas ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83、9591-9595、1986。M. Teintze ら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、211、804-811、1995等) で2～3回洗浄した。洗浄液を除去後、10 μ l の30mM Tris-HCl、200mM NaCl (pH7.5) を加えてビーズとよく混合した後、85°Cで8分間処理した。磁性ビーズ分離ラックを利用して2本鎖標的DNAを含む上清を回収した。

C. トランスフォーメーション

野島らの方法 (H. Inoue ら、Gene、96、23、1990) にしたがって大腸菌JM109株より調製したコンピーテントセル100 μ l を1.5ml 容量のマイクロ遠心チューブに取り、Bで回収した上清10 μ l を加えて混合後、水中で30分間保冷した。次に42°Cで30秒間保温した後、水中にもどして1～2分間冷却した。このチューブに0.5ml のSOC培地 (Bacto trypton 2%、Bacto yeast extract 0.5%、NaCl 10mM、KCl 2.5mM、MgCl₂ 10mM、MgSO₄ 10mM、グルコース 20mM) を加えて37°Cで1時間振盪後、LBプレート [20～70 μ g/ml アンピシリン、1mg

／プレート X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)、0.5～1.0mg／プレート IPTG (isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を含む。] にスプレッドして37°Cで一晩培養した。この条件では、2本鎖標的DNAである php53B をトランスフォームされた大腸菌は白色のコロニーを生じるが、非標的DNAである pUC18 をトランスフォームされた大腸菌は青色のコロニーを生じる。

種々の反応条件下で得られたトランスフォーメーションの結果を表2に示す。

【表1】

【RecA タンパク質／1本鎖DNAプロープ複合体の調製条件】

条件	ATP γ S 濃度 (μ M)	1本鎖DNA濃度(μ M)		ATP γ S/3'末端残基 (モル比)	RecA 濃度 (μ M)	ATP γ S/RecA (モル比)
		5'末端	3'末端			
A	6.0	1.0	29.0	1/5	6.0	1/1
B	6.0	1.0	29.0	1/5	12.0	1/2
C	7.5	1.0	29.0	1/4	7.5	1/1
D	7.5	1.0	29.0	1/4	15.0	1/2
E	10.0	1.0	29.0	1/3	10.0	1/1
F	15.0	1.0	29.0	1/2	15.0	1/1
G	20.0	1.0	29.0	2/3	10.0	2/1
H	50.0	1.0	29.0	16.7/1	10.0	5/1
I	100.0	1.0	29.0	33.3/1	10.0	10/1
J	300.0	1.0	29.0	10/1	10.0	30/1
K	500.0	1.0	29.0	16.7/1	10.0	50/1
L	2000	1.0	29.0	66.7/1	10.0	200/1

【表2】

[トランスフォーメーション結果]¹⁾

No.	RecA/7 ⁺ 0-7 ⁺ 複合体 調製条件	塩の種類	塩濃度 (mM)	白色コロニー数 (個)	青色コロニー数 (個)	特異性 (%) ²⁾
1	C	-	0	464	206	69.3
2	E	-	0	535	235	69.5
3	G	-	0	518	298	63.6
4	H	-	0	460	432	51.6
5	I	-	0	364	650	35.9
6	J	-	0	290	1518	16.0
7	K	-	0	271	2390	10.2
8	L	-	0	222	3742	5.6
9	A	NaCl	100	130	214	37.8
10	B	NaCl	100	256	204	55.7
11	C	NaCl	100	998	196	83.6
12	D	NaCl	100	1128	274	80.5
13	E	NaCl	100	1404	200	87.5
14	F	NaCl	100	1356	243	84.8
15	G	NaCl	100	1273	246	83.8
16	H	NaCl	100	1082	380	74.0
17	I	NaCl	100	806	640	55.7
18	J	NaCl	100	641	1326	32.6
19	K	NaCl	100	601	1624	27.0
20	L	NaCl	100	694	1773	25.1
21	E	NaCl	25	722	296	71.0
22	E	NaCl	50	798	194	80.4
23	E	NaCl	125	1182	148	88.9
24	E	NaCl	150	806	193	80.7
25	E	NaCl	50	1146	395	74.4
26	E	CH ₃ COONa	100	1932	376	83.7
27	E	CH ₃ COONa	200	1418	298	82.6
28	E	CH ₃ COONa	250	665	232	74.1
29	E	KCl	25	769	239	76.3
30	E	KCl	50	836	203	80.5
31	E	KCl	100	1471	226	86.7
32	E	KCl	125	1162	220	84.1
33	E	KCl	150	941	204	82.2
34	E	CH ₃ COOK	50	987	258	79.3
35	E	CH ₃ COOK	100	1526	300	83.6
36	E	CH ₃ COOK	200	1074	190	85.0
37	E	CH ₃ COOK	250	706	196	78.3

1): 同じ実験を3回ずつ繰り返して行ったデーターの平均値を示す。

2): 特異性 (%) = 白色のコロニー数 ÷ (白色のコロニー数 + 青色のコロニー数) × 100
として表した。

No. 1～8及び11～20の結果より、相同組換え反応（ハイブリダイゼーション反応）中にナトリウム等の塩が存在するしないにかかわらず、ATP γ Sの分子数が、1本鎖DNAプローブを構成するヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecAタンパク質の分子数の10倍以下であるような条件下で調製したRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体を用いて2本鎖標的DNAの単離を行った方（No. 1～5、11～17）が、米国特許第4,888,274号に記載されているような量のATP γ S（ヌクレオチド残基の分子数の10倍以上、RecAタンパク質の分子数の30倍以上、もしくは0.5～2 mM）存在下で調製したRecAタンバ

ク質/1本鎖DNAプローブ複合体を用いて行った場合 (No. 6 ~ 8、18 ~ 20) よりも、2本鎖標的DNAの収量、特異性ともにはるかに高かった。一方、ATP γ Sの分子数を、1本鎖DNAプローブを構成するヌクレオチド残基の分子数の1/5まで下げる (No. 9、10) と収量や特異性が低下した。

以上の結果より、ATP γ Sの分子数が、1本鎖DNAプローブを構成するヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、RecAタンパク質の分子数の10倍以下であるような条件下で調製したRecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体が、2本鎖標的DNAの単離に最適であり、該複合体を用いて2本鎖標的DNAの単離を行うと、極めて高い収量と特異性が得られることが判明した。

さらに、No. 1 ~ 8 と11、13、15 ~ 20の結果を比較すると、相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) 中に100mMの塩化ナトリウムが存在する方が、2本鎖標的DNAの収量、特異性ともに著しく向上することがわかった。

さらに、No. 13、21 ~ 24及びNo. 29 ~ 33の結果より、相同組換え反応 (ハイブリダイゼーション反応) 中に添加する塩化ナトリウム及び塩化カリウムの濃度は、150mM以下が好ましいことが判明した。一方、No. 25 ~ 28及びNo. 34 ~ 37の結果より、酢酸ナトリウム及び酢酸カリウムの濃度は、250mM以下が好ましいことが判明した。

これらの結果より、2本鎖標的核酸が閉環状の2本鎖DNAである場合には、25 ~ 150mM程度の塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、又は50 ~ 250mM程度の酢酸ナトリウムもしくは酢酸カリウムの共存下で相同組換え反応を行うことにより、2本鎖標的DNAの単離の精度 (fidelity) や特異性のみならず、反応効率や収量も著しく向上したと言える。このことは、大過剰のATP γ SやATPの存在下で、RecAタンパク質/1本鎖DNAプローブ複合体の調製と2本鎖標的DNAとの相同組換え反応とを同時に行った場合に見られた「100mMの塩化カリウム存在下で相同組換え反応を行うと、プローブ/2本鎖標的DNA複合体の収量は変化せずに、精度 (fidelity) や特異性だけが向上する (V.A. Malkov ら、

J.Mol.Biol., 271, 168-177, 1997)」とか、「DNA鎖交換反応 (strand exchange) は、50mMのナトリウム塩によって部分的に阻害され、100mM の塩化ナトリウムもしくは 200mM の酢酸ナトリウム存在下ではほぼ完全に阻害される (L.J.Roman ら、Biochemistry, 25, 7375-7385, 1986)」とか、「Dループ形成反応 (D-loop formation) は、20mMの塩化ナトリウムによって20%阻害され、50mMの塩化ナトリウムによって完全に阻害される (T.Shibata ら、J.Biol.Chem., 256, 7565-7572, 1981)」とかといった従来の知見とは、全く異なる新しい知見である。

産業上の利用の可能性

本発明により、試料中の2本鎖標的核酸に高い反応性及び特異性を示す RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ (2本鎖標的核酸配列と十分に相補的な配列を有するホモプローブを含む) 複合体の調製することが可能となった。本発明の方法により調製された RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を利用すれば、効率的に2本鎖標的核酸配列のターゲティング、濃縮(enrichment)、検出及び／又は単離を行うことができ、各種遺伝子異常や変異の診断、種々の病原性微生物やウイルスによる感染症の診断、遺伝子治療やトランスジェニック法への応用も可能である。

請求の範囲

1. 分子数が1本鎖核酸プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数の1/4以上で、かつ、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させることを特徴とする、RecA様組換え酵素/1本鎖核酸プローブ複合体を調製する方法。
2. 難分解性ヌクレオチドコファクターが $ATP \gamma S$ 、 $ADP \cdot AlF_4^-$ (ATP 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は ADP 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $dADP \cdot AlF_4^-$ ($dATP$ 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は $dADP$ 、硝酸アルミニウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、 $ADP \cdot BeF_3^-$ (ATP 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は ADP 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)、又は $dADP \cdot BeF_3^-$ ($dATP$ 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物、又は $dADP$ 、硫酸ベリリウム、及びフッ化ナトリウムの混合物)である請求項1に記載の方法。
3. ホモプローブが、互いに十分に相補的な少なくとも2種類のホモプローブである、請求項1に記載の方法。
4. 1本鎖核酸プローブ試料が、ホモプローブと、少なくとも1種類のヘテロプローブとの混合物である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. 0.5～2.0mMの Mg^{2+} 存在下で1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させる、請求項1に記載の方法。
6. RecA様組換え酵素が原核生物由来である、請求項1に記載の方法。
7. RecA様組換え酵素が大腸菌由来である、請求項1に記載の方法。
8. RecA様組換え酵素が標識又はリガンドを有する、請求項1、6、7のいずれかに記載の方法。

9. ホモプローブが標識又はリガンドを有する、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

10. 請求項 1～9 のいずれかに記載の RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体の調製に用いるための、RecA 様組換え酵素及び難分解性ヌクレオチドコファクターを含むキット。

11. 試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮 (enrichment)、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) 請求項 9 に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された 2 本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、及び

(c) 固相に捕捉されなかった 2 本鎖核酸及びプローブを除去する工程、を含む方法。

12. 試料中の 2 本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮、検出及び／又は単離する方法であって、

(a) 請求項 9 に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1 本鎖核酸プローブ複合体を形質転換可能なベクターに挿入された 2 本鎖標的核酸を含む試料に接触させる工程、

(b) 形成された 2 本鎖標的核酸と標識又はリガンドを有するホモプローブとの複合体を固相に捕捉する工程、

(c) 固相に捕捉されなかった 2 本鎖核酸及びプローブを除去する工程、

(d) 固相に捕捉された 2 本鎖標的核酸を含む画分を固相から遊離し、該 2 本鎖標的核酸を含む画分を適当な宿主細胞に形質転換する工程、及び

(e) 該 2 本鎖標的核酸を有する形質転換細胞を選択する工程、を含む方法。

13. 標識又はリガンドが、ビオチン又はジゴキシゲニンである、請求項 8、9、11、12 のいずれかに記載の方法。

14. 固相が、アビジン（ストレプトアビジン）又は抗ジゴキシゲニン抗体を結合させた磁性ビーズ（マグネットビーズ）である、請求項13に記載の方法。

15. 請求項8又は9に記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を用いる、固定細胞試料中に存在する2本鎖標的核酸をインサイチュハイブリダイゼーション法によって検出する方法。

16. 請求項1～9のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を用いる、生細胞試料中に存在する2本鎖標的核酸をインビボ遺伝子ターゲティング法によってターゲティングする方法。

17. 2本鎖標的核酸が2本鎖標的DNAである、請求項1、11、12、15、16のいずれかに記載の方法。

18. 1価のカチオン共存下で RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体と2本鎖標的核酸を含む試料とを反応させることを特徴とする、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

19. 1価のカチオンがナトリウムイオン又はカリウムイオンである、請求項18に記載の方法。

20. ナトリウムイオンが150mM以下の塩化ナトリウム又は250mM以下の酢酸ナトリウムに由来し、カリウムイオンが150mM以下の塩化カリウム又は250mM以下の酢酸カリウムに由来する、請求項19に記載の方法。

21. 請求項1～9のいずれかに記載の方法で調製した RecA 様組換え酵素／1本鎖核酸プローブ複合体を含む、試料中の2本鎖標的核酸をターゲティング、濃縮（enrichment）、検出及び／又は単離するためのキット。



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> DAIKIN INDUSTRIES, LTD.

ダイキン工業株式会社

<120> Method for preparing highly efficient RecA-like recombinase / single-stranded nucleic acid probe complex and its use

高性能なRecA様組換え酵素 / 1本鎖核酸プローブ複合体の調製方法及びその利用

<130> D2-001PCT

<150> JP 1998-280380

<151> 1998-10-01

<160> 3

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 275

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 1

ccttgccgtc ccaagcaatg gatgattga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt 60
tcactgaaga cccaggtcca gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgcgtagg 120
cccctgcacc agcagctcct acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccccctgt 180
catcttctgt cccttcccag aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct 240
tgcatcttgg gacagccaag tctgtgactt gcacg 275

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Primer Sequence

<400> 2

ccttgccgtc ccaagcaatg gatga 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Pri



mer Sequence

<400> 3

cgtgcaagtc acagacttgg ctgtc 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 1/68, C12N 15/10, C07H 21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 1/68, C12N 15/00-90, C07H 21/00-04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 4888274, A (Yale University), 19 December, 1989 (19.12.89) (Family: none)	1-21
A ✓	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 211, No. 3, p. 804-811, (1995), Martin Teintze et al., "RecA-assisted rapid enrichment of specific clones from model DNA libraries"	1-21
A ✓	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 92, No. 8, p. 3478-3482, (1995), Stephen C. Kowalczykowski et al., "DNA-strand exchange promot- ed by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transactions"	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent familyDate of the actual completion of the international search
04 January, 2000 (04.01.00)Date of mailing of the international search report
01 February, 2000 (01.02.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



1

2

3

4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 1/68, C12N 15/10, C07H 21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 1/68, C12N 15/00~90, C07H 21/00~04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 4888274, A (Yale University) 19.12月.1989 (19.12.89) ファミリーなし	1-21
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.211, No.3, p.804-811, (1995), Martin Teintze et al., "RecA-assisted rapid enrichment of specific clones from model DNA libraries"	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.01.00

国際調査報告の発送日

01.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, No. 8, p. 3478-3482, (1995), Stephen C. Kowalczykowski et al., "DNA-strand exchange promot- ed by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transactions"	1 - 2 1

ST
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference D2-001PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05420	International filing date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)	Priority date (day/month/year) 01 October 1998 (01.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/68, 15/10, C07H 21/00		
Applicant DAIKIN INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 March 2000 (17.03.00)	Date of completion of this report 19 October 2000 (19.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05420

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05420

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: US, 4888274, A (Yale University) 19 December 1989 (19.12.89)

Document 2: Martin Teintze et al., "RecA-assisted rapid enrichment of specific clones from model DNA libraries," Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 211, No. 3, 1995, pp. 804-811.

Document 3: Stephen C. Kowalczykowski et al., "DNA-strand exchange promoted by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-prompted nucleic acid transactions," Proc., Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, No. 8, 1995, pp. 3478-3482

The inventions set forth in Claims 1-3 appear to involve an inventive step with respect to documents 1-3 cited in the international search report. Documents 1-3 do not describe reacting a single-stranded nucleic acid probe sample, including a homoprobe, and an RecA-like recombinase in the presence of a hardly degradable nucleotide cofactor in which the number of molecules is at least 1/4 times larger than the number of the molecules in the nucleotide residues constituting the single-stranded nucleic acid probe and at 10 times less than the number of the molecules of the RecA-like recombinase, and persons skilled in the art cannot easily conceive of this matter from the descriptions in documents 1-3.

5T
aL

特 許 協 力 条 約

REC'D 06 NOV 2000

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 D2-001PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05420	国際出願日 (日.月.年) 01.10.99	優先日 (日.月.年) 01.10.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N 1/68, C12N 15/10, C07H 21/00		
出願人(氏名又は名称) ダイキン工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.03.00	国際予備審査報告を作成した日 19.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 上條 肇	4 B 9453
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-21

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-21

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-21

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1

US, 4888274, A (Yale University) 19.12月.1989 (19.12.89)

文献2

Martin Teintze et al., "RecA-assisted rapid enrichment of specific clones from model DNA libraries",
Biochemical and Biophysical Research Communications,
Vol.211, No.3, p.804-811, (1995)

文献3

Stephen C.Kowalczykowski et al., "DNA-strand exchange promoted by RecA protein in the absence of ATP: Implications for the mechanism of energy transduction in protein-promoted nucleic acid transactions", Proc.Natl.Acad.Sci.USA,
Vol.92, No.8, p.3478-3482, (1995)

1. 請求の範囲1~3に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~3に対して進歩性を有する。文献1~3には分子数が1本鎖プローブを構成しているヌクレオチド残基の分子数1/4以上で、かつ、RecA様組換え酵素の分子数の10倍以下である難分解性ヌクレオチドコファクターの存在下で、ホモプローブを含む1本鎖核酸プローブ試料とRecA様組換え酵素とを反応させることが記載されており、しかもその点は文献1~3から当業者といえども容易に想到し得ないものである。

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 D2-001PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05420	国際出願日 (日.月.年) 01.10.99	優先日 (日.月.年) 01.10.98
出願人(氏名又は名称) ダイキン工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

☒ なし

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 1/68, C12N 15/10, C07H 21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 1/68, C12N 15/00~90, C07H 21/00~04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 4888274, A (Yale University) 19.12月.1989 (19.12.89) ファミリーなし	1-21
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.211, No.3, p.804-811, (1995), Martin Teintze et al., "RecA-assisted rapid enrichment of specific clones from model DNA libraries"	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.01.00

国際調査報告の発送日

01.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
齋藤 真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の
カテゴリー*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する
請求の範囲の番号

A

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, No. 8, p. 3478-3482, (1995),
Stephen C. Kowalczykowski et al., "DNA-strand exchange promot-
ed by RecA protein in the absence of ATP: Implications for
the mechanism of energy transduction in protein-promoted
nucleic acid transactions"

1 - 2 1

